

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-62209

(43)公開日 平成8年(1996)3月8日

(51)Int.Cl.⁶
G 0 1 N 33/48
A 6 1 B 5/04
G 0 1 N 1/28

識別記号 庁内整理番号
M
Z

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 1/28 W
27/46 3 4 1 M

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-144768
(22)出願日 平成7年(1995)6月12日
(31)優先権主張番号 特願平6-130176
(32)優先日 平6(1994)6月13日
(33)優先権主張国 日本 (JP)

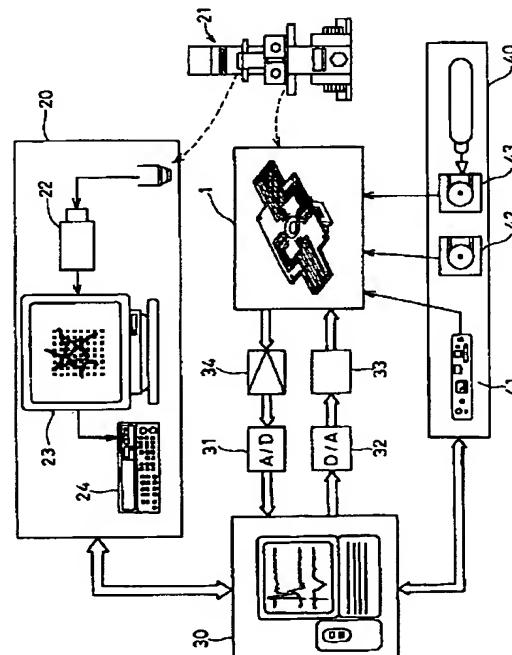
(71)出願人 000005821
松下電器産業株式会社
大阪府門真市大字門真1006番地
(72)発明者 杉原 宏和
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内
(72)発明者 亀井 明仁
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内
(72)発明者 小林 康
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内
(74)代理人 弁理士 池内 寛幸 (外1名)
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞電位測定装置

(57)【要約】

【目的】 細胞活動による電位変化の多点同時測定を可能にする一体化複合電極を用いて、測定を正確かつ効率的に行うことができるとともに測定結果の整理の便宜を図ることができる細胞電位測定装置を提供する。

【構成】 基板上に複数の微小電極をマトリックス状に配置され、その上に細胞を置くための細胞設置部を備え、微小電極からの引出しバターン及び外部接続用電気接点を備えた一体化複合電極を含む一体化細胞設置器1と、細胞を光学的に観察するための光学観察手段20と、細胞に電気的刺激を与えるために細胞設置器に接続される刺激信号付与手段30と、細胞の電気生理活動による出力信号を処理するために細胞設置器に接続される信号処理手段30とを備えている。好ましくは、一体化細胞設置器上の細胞の培養雰囲気を維持するための細胞培養手段40をも備えている。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞の電気生理学的特性を測定するための細胞電位測定装置であつて、

A. 基板上に複数の微小電極を備え、その上に細胞を置くための細胞設置部を備え、前記微小電極に電気信号を付与するとともに前記微小電極からの電気信号を導出するための電気接続手段を備えた一体化細胞設置器と、

B. 前記細胞に電気的刺激を与えるために前記一体化細胞設置器の電気接続手段に接続される刺激信号付与手段と、

C. 前記細胞の電気生理活動による出力信号を処理するために前記細胞設置器の電気接続手段に接続される信号処理手段

とを備えていることを特徴とする細胞電位測定装置。

【請求項2】 さらに、前記細胞を光学的に観察するための光学観察手段を備えている請求項1記載の細胞電位測定装置。

【請求項3】 さらに、前記一体化細胞設置器の上に置かれた細胞の培養雰囲気を維持するための細胞培養手段を備えている請求項1記載の細胞電位測定装置。

【請求項4】 細胞培養手段が、温度を一定に保つ温度調節手段と、培養液を循環する手段と、空気と二酸化炭素の混合気体を供給する手段とからなる請求項3記載の細胞電位測定装置。

【請求項5】 前記一体化細胞設置器は、ガラスプレート上にマトリックス状に配置された複数の微小電極と、これらの微小電極の引き出し用導電パターンと、これらの導電パターンの端部に接続された電気接点と、前記導電パターンの表面を覆う絶縁被膜とを備え、前記複数の微小電極を含む領域に前記細胞設置部が設けられている請求項1記載の細胞電位測定装置。

【請求項6】 前記複数の微小電極として64個の電極が8列8行に配置されている請求項1記載の細胞電位測定装置。

【請求項7】 前記微小電極のそれぞれの電極面積が $4 \times 10^2 \sim 4 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ の範囲内にある請求項1記載の細胞電位測定装置。

【請求項8】 前記電気接続手段は、前記電気接点に接触する接触金具を有し前記ガラスプレートを上下から挟んで固定する2分割ホルダを含んでいる請求項5記載の細胞電位測定装置。

【請求項9】 前記電気接続手段は、前記ホルダを固定すると共にコネクタを介して前記ホルダの接触金具に接続している外部接続パターンを有するプリント配線板をさらに備えている請求項5記載の細胞電位測定装置。

【請求項10】 前記電気接点と前記接触金具との接触抵抗、及び前記接触金具と前記コネクタとの接触抵抗がそれぞれ30ミリオーム以下である請求項8記載の細胞電位測定装置。

【請求項11】 前記光学観察手段が、光学顕微鏡と、

2

これに接続された撮像装置及び画像表示装置を備えている請求項1記載の細胞電位測定装置。

【請求項12】 前記光学観察手段が、さらに画像記憶装置を備えている請求項1記載の細胞電位測定装置。

【請求項13】 前記刺激信号付与手段がパルス信号発生器である請求項1記載の細胞電位測定装置。

【請求項14】 前記信号処理手段が、前記細胞の電気生理活動による出力信号を増幅する多チャンネル増幅器と、増幅された信号波形をリアルタイム表示する多チャンネル表示装置とを備えている請求項1記載の細胞電位測定装置。

【請求項15】 D/A変換器を介して前記刺激信号を出力するとともに、A/D変換器を介して前記細胞の電気生理活動による出力信号を入力して処理し、かつ、前記光学観察手段及び前記細胞培養手段の制御を行うコンピュータを備えている請求項1記載の細胞電位測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

20 【産業上の利用分野】 本発明は、神経細胞の活動に伴う電位変化などを測定するいわゆる電気神経生理の分野で用いられる細胞電位測定装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、神経細胞の医学的検討や電気素子としての適用の可能性の検討などが活発に行われてきている。神経細胞が活動する際には活動電位が発生する。この活動電位は、神経細胞のイオン透過性の変化に伴って細胞膜内外のイオン濃度が変化し、これに伴って細胞膜電位が変化することによって生じるものである。そこで、電極により神経細胞近傍のイオン濃度変化（すなわちイオン電流）に伴う電位変化を測定することによって、神経細胞の活動を検出することができる。

【0003】 上記のような細胞活動による電位はの測定は、例えば、ガラス製の細胞外電位測定用電極を細胞に挿入して行うことができる。刺激による誘発電位を測定する場合は、記録用のガラス電極と共に刺激用の金属電極も挿入される。しかし、これらの電極挿入による測定では細胞に損傷を与えるおそれがあり、長時間にわたって測定することが難しい。また、複数箇所を同時に測定することについても空間的な制限及び位置精度上の問題がある。

【0004】 そこで、絶縁性基板上に導電性物質を用いて複数の微小電極とその引出しパターンを形成し、この上での細胞培養を可能にした一体化複合電極が本発明者らによって発明された（特開平6-78889号公報、特開平6-296595号公報参照）。この一体化複合電極を用いれば、空間的な制約を受けることなく狭い間隔の複数箇所において同時に電位変化を測定することができ、しかも長時間にわたって測定することができる。

50 【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかし、このような一体化複合電極を最大限に活用して、測定を正確かつ効率的に行うことができるとともに測定結果の整理の便宜を図ることができる測定装置つまり測定システムが強く望まれていた。本発明は、かかる要望にかなう細胞電位測定装置を提供することを目的とするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明による細胞電位測定装置は、A. 基板上に複数の微小電極を備え、その上に細胞を置くための細胞設置部を備え、前記微小電極に電気信号を付与するとともに前記微小電極からの電気信号を導出するための電気接続手段を備えた一体化細胞設置器と、B. 前記細胞に電気的の刺激を与えるために前記細胞設置器の電気接続手段に接続される刺激信号付与手段と、C. 前記細胞の電気生理活動による出力信号を処理するために前記細胞設置器の電気接続手段に接続される信号処理手段とを備えていることを特徴とする。

【0007】好ましくは、前記細胞を光学的に観察するための光学観察手段を備え、さらに、前記一体化細胞設置器の上に置かれた細胞の培養雰囲気を維持するための細胞培養手段をさらに備えていることにより、長時間にわたる測定が可能となる。

【0008】他の好ましい構成については作用とともに後述する。

【0009】

【作用】上記のような構成を備えた本発明の装置による測定の概略は例えば以下のように行われる。一体化細胞設置器の細胞設置部に試料である細胞がセットされ、複数の微小電極がその細胞に接触する。光学観察手段によって得られる細胞の像を参照しながら、刺激信号付与手段によって電気接続手段を介して複数の微小電極うちの任意の一対の電極間に刺激信号を印加する。他の各電極に得られる誘導電位の時間変化が電気接続手段を介して信号処理手段に与えられ、必要な信号処理を経て例えば表示装置等に出力される。なお、刺激信号を与えない自発電位の測定も同様にして行われる。

【0010】上記のような細胞の電気化学的測定は、細胞が生きている状態で行う必要があるので、通常、培養細胞が用いられ、一体化細胞設置器の細胞設置部は培地を備えている。一体化細胞設置器は測定装置に対して着脱自在であり、一体化細胞設置器ごと通常のインキュベータに入れて細胞培養を行い、測定する際に一体化細胞設置器をインキュベータから取り出して測定装置にセットするようにしてもよいが、一体化細胞設置器上の細胞の培養雰囲気を維持するための細胞培養手段をさらに備えている場合は、長時間にわたる測定が可能となる。この細胞培養手段は、温度を一定に保つ温度調節手段と、培養液を循環する手段と、空気と二酸化炭素の混合気体（例えばCO₂ 5%）を供給する手段とから構成される。

【0011】好ましくは、前記一体化細胞設置器は、ガラスプレート上にマトリックス状（格子状）に配置された複数の微小電極と、これらの微小電極の引き出し用導電パターンと、これらの導電パターンの端部に接続された電気接点と、前記導電パターンの表面を覆う絶縁被膜とを備え、前記複数の微小電極を含む領域に前記細胞設置部が設けられている。透明ガラスプレートを基板とすることにより細胞の光学的観察が容易になる。したがって、導電パターンや絶縁被膜も実質的に透明または半透明であることが好ましい。また、複数の微小電極がマトリックス状に配置されておれば、刺激信号を印加する電極や細胞活動による電圧信号を検出する電極の位置指定をしやすい。例えば、64個の微小電極を8列8行に配置することが好ましい。また、各電極の表面積は、表面抵抗ができるだけ小さくして検出感度を高める観点からはできるだけ広いほうが良いが、電極間隔からの制約および測定の分解能等を考慮して、 $4 \times 10^2 \sim 4 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ の範囲内にあることが好ましい。

【0012】前記電気接続手段は、前記電気接点に接触する接触金具を有し前記ガラスプレートを上下から挟んで固定する2分割ホルダを含んでいることが好ましく、このような構造により前記ガラスプレートの固定及び微小電極の外部への引出しが容易かつ確実に行われる。さらに、前記ホルダを固定するとともに、前記ホルダの接触金具にコネクタを介して接続する外部接続パターンを有するプリント配線板をさらに備えていることが好ましく、これにより外部機器、つまり刺激信号付与手段及び信号処理手段との接続が容易になる。刺激信号や検出信号をできるだけ減衰及び歪みなく伝達するためには、前記電気接点と前記接触金具との接触抵抗、及び前記接触金具と前記コネクタとの接触抵抗がそれぞれ30ミリオーム以下であることが好ましい。

【0013】前記光学観察手段は、光学顕微鏡と、これに接続された撮像装置及び画像表示装置を備えていることが好ましい。つまり、顕微鏡で拡大された細胞の像が撮像装置（ビデオカメラ）で撮像されて画像表示装置（高精細度ディスプレー）に表示されることにより、細胞と電極位置を視覚的に把握しながら測定を行うことが容易になる。さらに好ましくは、光学観察手段が画像記憶装置を備えておれば、測定結果の記録等に便利である。

【0014】また、前記刺激信号付与手段にパルス信号発生器を用いることにより、多くの種類の信号波形を刺激信号として細胞に印加することができる。前記信号処理手段は、細胞活動による検出信号を増幅する多チャンネル増幅器と、増幅された信号波形をリアルタイム表示する多チャンネル表示装置とを備え、複数の電極から得られた信号波形（細胞電位の時間変化）を同時に表示できることが好ましい。

【0015】一方、D/A変換器を介して前記刺激信号

を出力するとともに、A/D変換器を介して前記細胞の電気生理活動による出力信号を入力して処理するコンピュータをさらに備えていることが好ましく、これによって、刺激信号を画面上で任意の波形に設定したり、検出信号の波形を画面に表示させるのみならず種々の加工を施して表示し、プロッタに出力し、または記憶するといったことが容易になる。さらに、このコンピュータを用いて前記光学観察手段や前記細胞培養手段の制御を行うこともできる。

【0016】

【実施例】以下本発明の実施例を図面に基づいて説明する。

【0017】まず、本測定装置に使用する一体化細胞設置器について説明する。この一体化細胞設置器1は、図1に斜視図を、図2に組立図をそれぞれ示すように、ガラスプレートに複数の微小電極及びその引出しパターンが設けられた一体化複合電極2、それを上下から挟んで固定する2分割ホルダ3、4及び、このホルダを固定するプリント配線板5からなる。

【0018】一体化複合電極については、特開平6-78889号公報等に開示されているものとほぼ同様である。厚さ1.1mm、大きさ50mm角の透明バイレックスガラスからなる基板の中央部に64個の微小電極11が8×8のマトリックス状に形成され、各微小電極には引出し用導電パターン12が接続されている(図3参照)。各電極11は50μm角(面積25×10²μm²)であり、隣接する電極の中心間距離は450μmである。また基板の4辺には、各々16個、計64個の電気接点7が形成され(図2参照)、これらの電気接点と基板中央部の64個の微小電極とが1対1で対応するよう引出し用導電パターン12で接続されている。各辺の16個の電気接点はピッチ1.27mmで並んでいる。この一体化複合電極2の製造方法を図4の断面図に基づいて以下に説明する。なお、図4は見易さのために各部の縮尺を変えて描いている。

【0019】ガラスプレート13の表面に150nm厚のITO(酸化インジウム錫)膜を塗布し、フォトレジスト及びエッチングにより導電パターン12を形成する。この上に1.4μm厚のネガティブフォトセンシティブポリイミド膜を塗布し、同様に絶縁被膜14を形成する。微小電極及び電気接点の部分はITO膜が露出しており、この部分に500nm厚のニッケルメッキ15及び50nm厚の金メッキ16を施す。内径2.2mm、外径2.6mm、高さ8mmの円筒状ポリスチレン枠6(図2参照)をガラスプレートに(導電パターン8及び絶縁被膜9を介して)シリコーン系接着剤を用いて接着する。この円筒状ポリスチレン枠はガラスプレートの中心、すなわち64個の微小電極の中心部と中心合わせした状態で固定され、このポリスチレン枠の内側が細胞設置部に相当する。このポリスチレン枠内に1重量%クロ

ロ白金酸、0.01重量%酢酸鉛、0.0025重量%塩酸の水溶液を満たし、20mA/cm²の電流を1分間通電することによって微小電極部の金メッキの表面に白金黒11aを析出させる。

【0020】次に、一体化複合電極2を上下から挟んで固定する2分割ホルダ3、4について説明する。ホルダ3、4は樹脂で形成され、図2に示すように、一体化複合電極2の縁部を保持するための段部と矩形開口とが中央部に備えられている。上部ホルダ3には一対の固定具8と16個×4対の接触金具9が備えられている。一体化複合電極2を挟んで固定したホルダ3、4の上面図を図5(A)に、その側面図(B-B断面図)を図5(B)に、そして裏側からみた斜視図を図6にそれぞれ示す。これらの図からもわかるように、固定具8は上部ホルダ3の対向する2辺に軸ピン8aによって枢支されている。また、下部ホルダ4の裏面の対向する2辺には溝4aが形成されており、ここに固定具8の凸条8bが嵌まることによって上下のホルダ3、4は一体化複合電極2を挟んだ状態でしっかりと固定される。

【0021】一体化複合電極2の電気接点7に対応するように上部ホルダ3設けられた64個の接触金具9は、BeCuにNi及びAuメッキを施したもののような弾力性に富む良導体金属板を加工して形成され、図7に示すような形状をしている。つまり、ピン部9aとその基部9b、そして、この基部9bから湾曲部9cを介して延びる可動接触部9dからなる。このような構造により、可動接触部9dは基部9bに対して弾性変位可能である。上部ホルダ3には接触金具9のピン部9aが挿通される孔と基部9bが嵌まる溝とが64(16×4)箇所に形成されている。

【0022】図2及び図5(B)に示すように、接触金具9が上記孔及び溝に挿入され固定された状態で、ピン部9aが上部ホルダ3から突出している。基部9bの長さが異なる2種類の接触金具9が交互に配置されることにより、上部ホルダ3から突出した16個のピン部9aは千鳥状の2列に並んでいる。後述するように、これらのピン部9aは外部との接続用のプリント配線板5に実装されたコネクタに接続される。

【0023】一方、接触金具9の可動接触部9dは、接觸金具9が上部ホルダ3の孔及び溝に挿入され固定された状態で、上部ホルダ3の下面から突出している。この状態は、図2の組立図に対して反対側から見た組立図である図8に良く示されている。一体化複合電極2を挟んでホルダ3、4が固定された状態で、各接触金具9の可動接触部9dが一体化複合電極2の電気接点7に接觸し、湾曲部9cの弾性変形によって所定の接触圧が接觸部に与えられている。このようにして一体化複合電極2の微小電極11に導電パターン12を介して接続する電気接点7は、接触金具9に対して小さい接触抵抗(30ミリオーム以下)で電気的に接続される。

【0024】次に、プリント配線板5について説明する。このプリント配線板5は、一体化複合電極2とホルダ3、4との組立品を固定するとともに、一体化複合電極2の微小電極11から導電パターン12、電気接点7、そして接触金具9に至る電気接続をさらにコネクタを介して外部に引き出す役目を担っている。また、測定装置へのセット等の取り扱いを容易にする働きをしている。

【0025】このプリント配線板5は両面パターンのガラスエポキシ基板を用いて構成されており、図8に示された裏面において、中央部に形成された円形開口の周囲4箇所にコネクタ5aが設けられている。上部ホルダ3の表面4箇所から2列千鳥状に突出した16個のピン部9aがそれぞれ対応するコネクタ5aに挿入されることにより、一体化複合電極2とホルダ3、4との組立品がプリント配線板5に固定されるとともに電気的に接続される。

【0026】プリント配線板5の両側エッジ部5bには両面エッジコネクタ用の2.54mmピッチの電気接点が形成され、これらの電気接点と中央部のコネクタ5aとが引出しパターン5cで接続されている。両側コネクタ5aの内側列は表面パターンで、外側列は裏面パターンでそれぞれ引き出され、それぞれのエッジ部5bに表裏両面で32個、したがって合計64個の電気接点が形成されている。機械的な固定を確実なものとするために、ビス止めによって上部ホルダ3をプリント配線板5に固定することもできる。

【0027】以上のように構成された一体化細胞設置器1を用いて構成した細胞電位測定装置の好適な実施例を図9に示す。本実施例の測定装置は、上述した一体化細胞設置器1と、この一体化細胞設置器1にセットされた細胞を光学的に観察するための倒立顕微鏡21を含む光学観察手段20と、細胞への刺激信号を付与する手段及び細胞からの出力信号を処理する手段を含むコンピュータ30と、細胞の培養雰囲気を維持するための細胞培養手段40とを備えている。

【0028】光学観察手段20には、一体化細胞設置器1がセットされる倒立顕微鏡21（オリンパス製IMT-2-F又はIX70相当品）の他に、顕微鏡用のSITカメラ（浜松ホトニクス製C2400-08相当品）22、高精細度ディスプレー23、及び画像ファイル装置（松下電器製TQ-2600又はFTQ-3100F相当品）24が含まれている。但し、高精細度ディスプレーはコンピュータ30のディスプレーを兼用してもよい。尚、上記の括弧内に示した具体的な装置は一例であり、これらに限られるものではない。以下同様である。

【0029】コンピュータ30には、WINDOWS対応のパーソナルコンピュータにA/D変換ボード及び測定用ソフトウェアを搭載したものが使用される。A/D変換ボードは図9のA/D変換器31とD/A変換器3

2を含んでいる。A/D変換器31は16ビット64チャネルであり、D/A変換器32は16ビット8チャネルである。

【0030】測定用ソフトウェアは刺激信号付与の条件や得られた検出信号の記録条件を設定するためのソフトウェアを含んでいる。この測定用ソフトウェアによって、コンピュータ30は細胞に刺激信号を付与する手段と、細胞から検出された信号を処理する手段とを構成するだけでなく、光学観察手段（SITカメラ及び画像ファイル装置）や細胞培養手段の制御をも司る。以下に、測定用ソフトウェアの主な仕様を画面ごとに説明する。

【0031】パラメータ設定画面では、キーボード又はマウスを用いて画面上で刺激波形を描くことにより、複雑な刺激条件の設定が可能である。また、記録条件の設定は、入力チャンネル数64、サンプリングレート10kHzで数時間の連続記録に対応できるようにしている。さらに、刺激信号を付与する電極や細胞からの検出信号を取り出す電極の指定に関しては、画面上に表示された顕微鏡像をマウスやペンで指示することにより指定できるようにしている。その他、細胞培養手段40の温度やpH等の諸条件の設定をキーボードを用いて行うことができる。

【0032】記録画面では、細胞から検出された自発活動電位又は誘導電位をリアルタイムで最大64チャネル表示する。また、記録された自発活動電位又は誘導電位を細胞の顕微鏡像に重ねて表示することもできる。誘導電位測定の場合は記録波形全体を表示する。自発活動電位測定の場合は、ウインドーディスクリミネータ又は波形ディスクリミネータを用いたスパイク検出機能によって自発活動の発生が検出されたときのみ記録波形が表示される。記録波形の表示と共に、記録時の測定パラメータ（刺激条件、記録条件、温度、pH等）もリアルタイムで表示される。温度又はpHが許容範囲を外れたときの警報機能も備えられている。

【0033】データ解析画面では、FFT解析、コヒーレンス解析、コリレーション解析が可能である。波形ディスクリミネータを用いたシングルスパイク分離機能、テンポラルプロファイル表示機能、トポグラフィー表示機能、電流源密度解析機能等も備えている。これらの解析結果は、画像ファイル装置に保存されている顕微鏡像に重ねて表示することができる。

【0034】以上のようなコンピュータ30から刺激信号が outputされる場合、この刺激信号はD/A変換器32及びアイソレーター（BAK ELECTRONICS社製BSI-2相当品）33を経て細胞に与えられる。つまり、一体化細胞設置器1の64個の微小電極11のうちの選択された2点間に刺激信号が印加される。そして、各微小電極11とGNDレベル（培養液の電位）との間に生ずる誘導電位は、64チャネル分の高感度増幅器（日本光電AB-610J相当品）34及びA/D変換器31を経て

コンピュータ30に入力される。なお、増幅器34の増幅率は100dB、周波数帯域は0~10kHzである。但し、刺激信号による誘導電位の測定の場合はローカットフィルタにより100Hz~10kHzの周波数帯域としている。

【0035】次に、細胞培養手段40には、温度調節器41と、培養液の循環手段42と、空気及び二酸化炭素の混合ガスを供給する手段43とが備えられている。実際には、Medical Systems社製のマイクロインキュベータPDMI-2相当品と温度コントローラTC-202相当品、そして、CO₂ポンベ等を用いて細胞培養手段40が構成される。このマイクロインキュベータはペルチエ素子によって0~50℃の温度範囲に制御することができ、液送速度3.0m1/m1n以下、給気速度1.0l/m1n以下に対応しうる。あるいは、温度コントローラを内蔵しているマイクロインキュベータ（オリンパス社製IMT2-1BSV）を用いてもよい。

【0036】以上、本発明による細胞電位測定装置の好適な実施例を説明したが、本発明による細胞電位測定装置は上記実施例に限定されるものではなく、例えば以下に述べるような種々の変更実施が可能である。

【0037】上記実施例では細胞に刺激信号を与える手段をコンピュータ及びD/A変換器で構成したが、汎用または専用のパルス信号発生器で構成してもよい。尚、刺激信号は、アーチファクトの影響を除くため、即ち、直流成分が流れないようにするために、正負一対のパルスで構成された双極性定電圧パルスとすることが好ましい。また、過電流を流さないように定電流パルスに変換することが好ましい。例えば、パルス幅100μsecの正パルス、100μsecの間隔、100μsecの負パルスで刺激信号が構成され、正負パルスのピーク電流は30~200μAの範囲内にあることが好ましい。

【0038】また、細胞培養手段40が測定装置に備えられていることにより、長期にわたる連続測定が可能であるが、測定装置とは別に設置されたインキュベータ内で、試料細胞を一体化細胞設置器にセットしたままで培養し、比較的短時間の測定の際だけ一体化細胞設置器をインキュベータから取り出して測定装置にセットするようにしてもよい。この場合は細胞培養手段40が測定装置に備えられている必要はない。

【0039】以上のような細胞電位測定装置を用いて、実際に一体化細胞設置器上で培養された神経細胞又は組織の活動に伴う電位変化を測定した例について以下に説明する。神経組織としてラット大脳皮質の切片を用い、後述する培養法実施例に示す方法で培養した。

【0040】先ず、本装置の一体化細胞設置器を用いて測定された電圧波形と従来の汎用ガラス電極（細胞外電位測定用電極）を用いて測定された電圧波形とを比較した結果について説明しておく。測定は、培養開始後14日を経過した神経組織を試料として行った。一体化細胞

設置器を構成する一体化複合電極の隣接する2つの電極間に刺激信号を印加し、その近くの8個の電極に誘起される誘導電位の時間変化の波形を測定した。そして比較するために、ガラス電極を3次元マイクロマニピュレータを用いて上記8個の電極の近傍に順次移動させて同様の電圧波形を測定した。

【0041】上記のように、8箇所について一体化複合電極（一体化細胞設置器）を用いて測定した電圧波形とガラス電極を用いて測定した波形とを比較した結果、両者10の波形はいずれの箇所においてもよく近似していた。その代表例を図10(A)及び(B)に示す。図10(A)は一体化複合電極による測定波形を示し、図10(B)はガラス電極による測定波形を示す。両波形を比べると、周波数特性にやや差があることがわかる。ガラス電極を用いた測定は、一体化複合電極（プラナー電極）を用いた測定に比べ、速い電位変化に対する追従性が若干損なわれている。この差は、ガラス電極とプラナー電極の持つ電気容量の差に起因すると考えられる。

【0042】次に、一体化細胞設置器上で培養された神20経細胞の培養日数と細胞の活動による電位の分布との関係を調べた実験結果を説明する。なお、細胞の培養に先立って、一体化複合電極の各電極と細胞との接着性を高める目的で、一体化複合電極の表面をコラーゲンゲルで覆った。つまり、前述のように白金黒で被覆された各電極表面と、その周辺の絶縁被膜表面に厚さ50μm以下のコラーゲンゲルを形成した。そして、コラーゲンゲル上に、かつ、微小電極上に位置するようにラット大脳皮質の切片（厚さ500μm以下）を置いて培養した。図11に自発電位の測定結果を、図12に刺激信号を与えたときの誘導電位の測定結果を示す。

【0043】図11(A)に試料細胞及び微小電極の顕微鏡像が示されており、この像に1~7で指示されている7箇所の電極で測定された自発電位の波形がそれぞれ図11(B)及び(C)に示されている。図11(B)は培養後6日目の波形であり、図11(C)は培養後10日目の波形である。顕微鏡像のスケール、測定波形の時間及び電圧のスケールは図中に示している通りである。この測定結果から例えば、培養後6日目では各電極40で測定される細胞の自発活動が弱く電極相互の同期性がほとんど見られないのに対し、培養後10日目になると多数の神経細胞が同時に活動するようになり電極相互の同期性が高まっていることがわかる。

【0044】図12(A)にも試料細胞及び微小電極の顕微鏡像が示されている。そして、前述のコンピュータの測定用ソフトウェアに含まれる画像処理によって、この顕微鏡像から細胞の輪郭及び各電極の位置を画面上に描き、さらに、各電極で測定された電圧波形を重ねて表示したものが図12(B)及び(C)に表示されている。図12(B)は培養後5日目、図12(C)は培養50後10日目の誘導電位の分布をそれぞれ示している。右

上にある+、-で指示された一対の電極が刺激信号を印加された電極である。各電極の位置を示す小四角記号のすぐ上にその電極で測定された波形が表示されている。これらの波形において、左端の大きく縦に振れている部分は刺激信号に直接対応するアーチファクトであって、その後にある電位変化が実際の細胞活動を示している。この測定結果から例えば、培養後5日目では細胞の活動が刺激信号を印加した電極位置の比較的近傍に限られているが、培養後10日目になると細胞の活動は広い範囲にわたって観測され、その大きさ(振幅)が大きくなることがわかる。

【大脳皮質培養法実施例】

(1) 培地

ダルベッコ改変イーグル培地とハムF12培地の1:1混合培地(GIBCO Co., LTD. 430-2500EB)に、以下の添加物を加えて用いた。

*グルコース(glucose, GIBCO 820-50231N) 2.85mg/L
(上記培地にもともと含まれているものと合わせて、トータル6mg/Lになる)
*ブトレシン(putrescine, SIGMA Co., LTD. P5780) 100μM
*プロジェステロン(progesterone, SIGMA P8783) 20nM
*ハイドロコルチゾン(hydrocortisone, SIGMA H0888) 20nM
*亜セレン酸ナトリウム(sodium selenite, WAKO Co., LTD. 198-0319) 20nM
*インシュリン(insulin, SIGMA 16634) 5mg/L
*トランスフェリン(transferrin, SIGMA T1147) 100mg/L
*重炭酸ナトリウム 2.438mg/L
*1N HCl又は1N NaOHを適量加え、pH7.4に調整する。

【0045】以上の添加物を加え濾過滅菌した後、4℃で保存し使用に備えた。以下、本培地を、単に「培地」と呼ぶ。

(2) 一体化複合電極上のウエルの構成

一体化複合電極上での神経細胞または神経組織の培養の便を図るために、内径22mm、外径26mm、高さ8mmのポリスチレン製円筒を、以下に記載する方法で接着した。

(イ) ポリスチレン製円筒(内径22mm、外径26mm、高さ8mm)の下面に、1液性シリコン系接着剤(ダウコーン891または信越化学KE-42RTV)を必要十分量塗布する。

(ロ) 一体化複合電極のガラス基板中心とポリスチレン製円筒の中心が一致するよう注意しながら、両者を接着する。

(ハ) 埃の入りにくい環境で24時間放置することにより、接着剤を固化させる。

(二) 70%エタノールに5分漬けた後クリーンベンチ内で風乾することによって滅菌を行い、電極表面の処理に備える。

(3) 電極表面の処理

一体化複合電極表面の細胞接着性を高めるため、以下の方法で電極表面にコラーゲンゲルを構成した。以下の操作は、全て無菌的雰囲気下で行った。

(イ) 以下のA、B、Cの溶液を用意し、氷冷しておく。

A. 0.3vol.%希塩酸コラーゲン溶液(pH3.0, 新田ゼラチンCellmatrix TypeI-A)
B. ダブルベッコ改変イーグル溶液とハムF12培地の1:1混合培地(GIBCO 430-2500EB)に重炭酸ナトリウムを加えないで、通常用いる際の10倍濃度の液を作り、濾過滅菌したもの

C. 0.05N水酸化ナトリウム溶液100mLに対し、重炭酸ナトリウム2.2g, HEPES(GIBCO 845-1344IM)4.77gを溶かし、濾過滅菌したもの

(ロ) 冷却しながら、A、B、C液を8:1:1の割合で混合する。この際、AとBをよく混合した後にCを加え、さらに混合する。

(ハ) あらかじめ4℃程度に冷却しておいた一体化複合電極のウエル内に、(ロ)の混合溶液1mLを分注し、電極表面をまんべんなく覆わせた後、ガラスバストールビペットで混合溶液をできる限り取り除く。この操作により、電極表面上に厚さ50μm以下の混合用液の被膜が構成される。

(二) 混合用液被膜を構成した一体化複合電極を37℃で30分間暖めることにより、混合用液をゲル化させ、コラーゲンマトリクスを構成する。

(ホ) 一体化複合電極のウエル内に滅菌水1mLを加え、約5分間放置した後取り除くことにより洗浄を行う。

30 (ヘ) (ホ)の操作を、あと2回(計3回)繰り返す。

(ト) 一体化複合電極のウエル内に、ダルベッコ改変イーグル培地とハムF12培地の1:1混合培地(GIBCO 430-2500EB)に上記の添加物を加えたもの(ただしインシュリンとトランスフェリンを除く)1mLを分注し、温度37℃、相対湿度97%以上、CO₂濃度5%、空気濃度95%に保ったCO₂インキュベーター内に保存し、使用に備える。

(4) 神経細胞または神経組織の培養

培養形態は大まかに2種類に分けられる。すなわち、神40 経細胞の分散培養と神経組織の器官培養である。以下、各々について述べる。

(4-1) ラット大脳皮質視覚野神経細胞の分散培養法
以下の操作は、全て菌的雰囲気下で行った。

(イ) 妊娠後16~18日を経過したSDラットの胎児の脳を摘出し、氷冷したハンクス平衡塩液(GIBCO 450-1250EB)に浸す。

(ロ) 氷冷ハンクス平衡塩液中の脳から視覚皮質を切り出し、トル最小必須培地(GIBCO 410-1100EB)液中に移す。

50 (ハ) イーグル最小必須培地液中で、視覚皮質をできる

だけ細かく、最大でも 0.2 mm 角となるように切断する。

(二) 細かく切断した視覚皮質を遠心分離用試験管に入れ、カルシウムおよびマグネシウムを含まないハンクス平衡塩液で 3 回洗浄した後、適量の同液中に分散する。

(ホ) 上記 (二) の遠心分離用試験管中に、0.25% のトリプシンを溶解したカルシウム及びマグネシウムを含まないハンクス平衡塩液を加え、全量を倍にする。緩やかに攪拌しながら、37℃で 15 分間恒温状態に保ち、酵素反応を行わせる。

(ヘ) 前記 (1-1) で示した培地 (添加物含む。以下、「培地」と略す) に、さらに 10 vol. % の牛胎児血清を加えたものを、上記ホ) を経た遠心分離用試験管中に加え、全量をさらに倍にする。先端をバーナーであぶり口径を小さくしたガラスバストールビペットで、緩やかにビベッティングを繰り返し (最大 20 回程度)、個々の細胞を単離する。

(ト) 9806.65 m/sec² (すなわち 1000 g) で 5 分間遠心分離を行った。遠心分離終了後、上清を捨て、沈殿を 5% の牛胎児血清を含む培地に懸濁する。

(チ) 前記 (ト) をあと 2 回 (計 3 回) 繰り返す。

(リ) 最終的の得られた沈殿を、5 vol. % の牛胎児血清を含む培地に懸濁し、懸濁液中の細胞濃度を赤血球計数板を用いて計測する。計測後、同様の培地を用いて細胞濃度が $2 \sim 4 \times 10^6$ 個/ml になるように調整する。

(ヌ) 前記 (1-3) の処理を経た後 CO₂ インキュベータ内に保存しておいた一体化複合電極を取り出し、ウエル内の培地 (ただしインシュリンおよびトランスフェリンを含まない) を取り去り、新たに 5 vol. % の牛胎児血清を含む培地 500 μL を分注する。さらに、リ) の細胞濃度調整後の細胞懸濁液 100 μL を静かに加え、再び CO₂ インキュベータ内に静置する。

(ル) 前記 (ヌ) の操作より 3 日後に、培地の半量を新しいものと交換する。交換する培地は牛胎児血清を含まない培地を用いた。牛胎児血清の濃度を低くすることによって、神経細胞以外の細胞 (例えばクリア細胞) の増殖を抑える。

(ヲ) 以後 1 ~ 2 日毎に上記と同様の培地交換を行う。

(4-2) ラット大脳皮質切片培養法

(イ) 生後 2 日目の SD ラットから、脳を取り出し、氷冷した 0.25 vol. % D-グルコース入りハンクス平衡塩液に浸す。

(ロ) 氷冷した 0.25 vol. % D-グルコース入り HBSS 中で、脳に付着している脳膜を、大脳皮質を傷つけないように注意しながら、先の鋭利なピンセットを用いて除く。

(ハ) 脳膜を除いた大脳皮質の片側の脳梁から 500 μm 程度のところを、眼科手術用の微小ハサミを用いて、脳梁にそって後頭葉側から前頭葉側に向かって切断す

る。

(二) 続いて、眼科手術用の微小ハサミを用いて、

(ハ) の切断面に垂直に 200 ~ 300 μm の厚さで大脳皮質を切断し、切片を作る。

(ホ) さらに、眼科手術用の微小ハサミを用いて、切片の大きさを 1 × 1 度程に調整する。

(ヘ) 前述の「(3) 電極表面の処理」で用意しておいた一体化複合電極を CO₂ インキュベータから取り出し、大きさを調整した大脳皮質切片を口径 2 mm 以上の

10 ピペットで傷つけないように静かに吸い取り、一体化複合電極の培養用ウエル中に移す。

(ト) バーナーであぶり先端を滑らかにしたバストールピペットを用い、大脳皮質切片を傷つけないように注意しながら、皮質の層構造が上面を向きかつ電極上に位置するように調整する。

(チ) 大脳皮質切片を一体化複合電極上にのせた後、培地の量を調整し、切片の底面が培地に触れ、上面が外気に触れる状態にする。

(リ) 培地量の調整後、一体化複合電極を滅菌ベトリ皿 20 に入れ、培地の乾燥を防ぐために 37℃ の滅菌水約 5 ml をベトリ皿に分注し、再び CO₂ インキュベータ内に静置する。

(ヌ) 以降、培地の量に注意し、毎日 1 回の培地交換を行った。培地の量については、上記 (チ) と同様とする。

【0046】

【発明の効果】 以上、説明したように、本発明の細胞電位測定装置によれば、一体化細胞設置器にセットされた生きている細胞に損傷を与えることなく、同時に複数の箇所でその活動電位を測定することができる。そして、任意の複数の電極から自発電位を測定できるだけでなく、任意の電極間に刺激を与えて得られる誘発電位の測定についても、複数の電極で同時に行うことができる。

また、コンピュータ等を用いた処理により、例えば光学観察手段によって得られた顕微鏡像から試料細胞と電極位置との関係を確認しながら刺激信号を与える電極を決めたり、各電極から得られた電圧波形を細胞や電極位置を示す像に重ねて表示するといったことも可能であり、電気神経生理学の分野等における実験を効率的かつ正確 40 なものとするのに大きく寄与することができる。

【0047】 さらに、一体化細胞設置器にセットされた細胞の培養雰囲気を維持する細胞培養手段を備えることにより、試料細胞を測定装置にセットしたままで長期間にわたる連続測定を安定した状態で行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の一実施例に係る細胞電位測定装置に使用される一体化細胞設置器の斜視図

【図 2】 一体化細胞設置器の組立図

【図 3】 一体化細胞設置器を構成する一体化複合電極 50 の中央部に設けられた 64 個の微小電極及び引出しバタ

ーンを示す平面図

【図 4】 一体化複合電極の断面を模式的に示す図

【図 5】 一体化複合電極を上部及び下部ホルダが挟んで固定した状態を示す平面図及び側面断面図

【図 6】 図 5の一体化複合電極及び上下ホルダの斜視図

【図 7】 上部ホルダに備えられた接触金具の側面図

【図 8】 図 2 と逆の方向から見た一体化細胞設置器の組立図

【図 9】 本発明の一実施例に係る細胞電位測定装置の 10 ブロック構成図

【図 10】 本発明の装置に使用される一体化細胞設置器を用いて測定された培養細胞の活動による電圧波形と従来の汎用ガラス電極（細胞外電位測定用電極）を用いて測定された電圧波形との比較の一例を示す図

【図 11】 本発明の装置を用いて測定された培養細胞の自発電位の測定結果を示す図

【図 12】 本発明の装置を用いて測定された培養細胞の誘発電位の測定結果を示す図

【符号の説明】

1 一体化細胞設置器

2 一体化複合電極

3 上部ホルダ

4 下部ホルダ

5 プリント配線板

11 微小電極

12 導電パターン

20 光学観察手段

21 倒立顕微鏡

22 S I T カメラ

24 画像記憶装置

30 コンピュータ

31 A/D 変換器

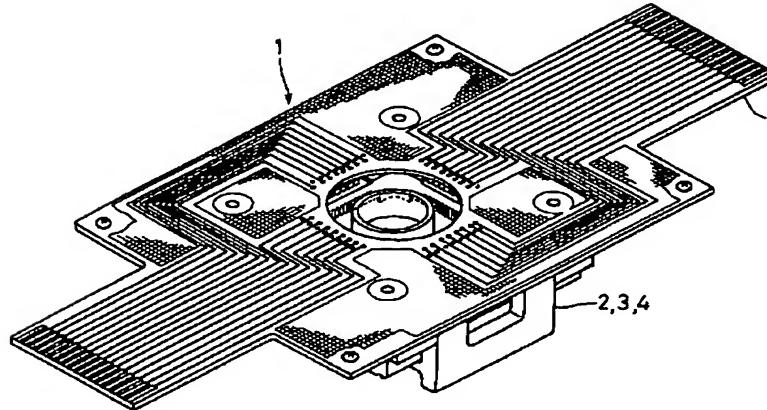
32 D/A 変換器

33 アイソレータ

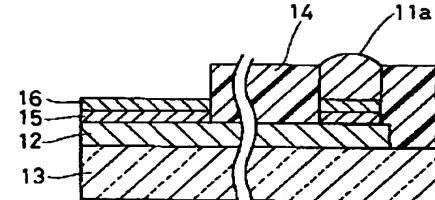
34 多チャンネル増幅器

40 細胞培養手段

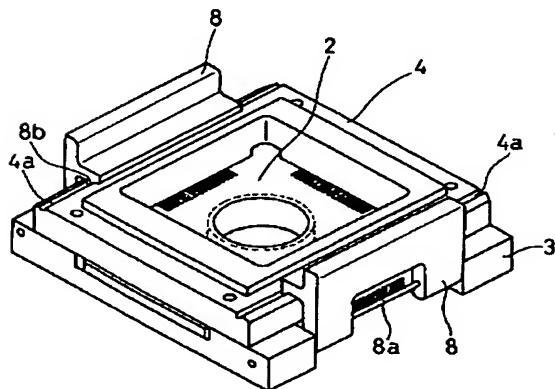
【図 1】



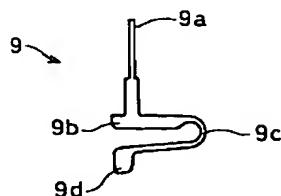
【図 4】



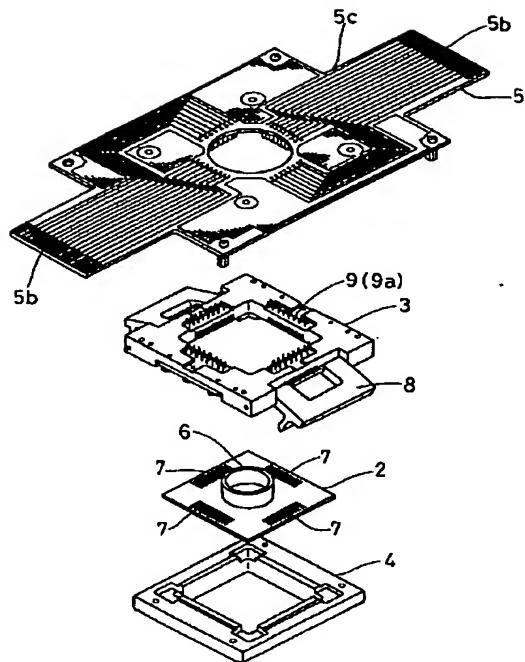
【図 6】



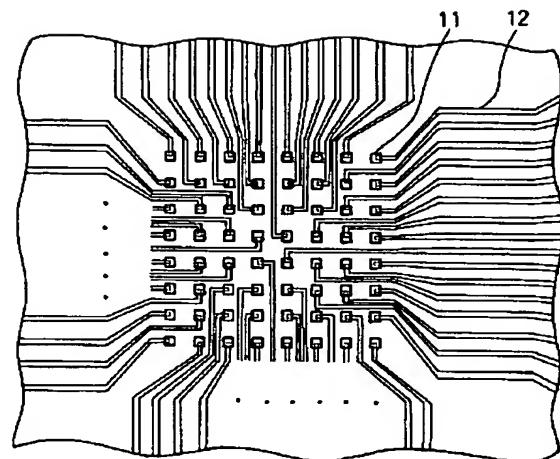
【図 7】



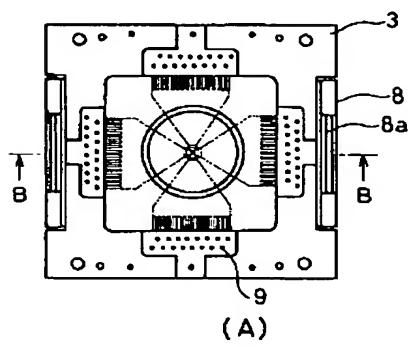
【図2】



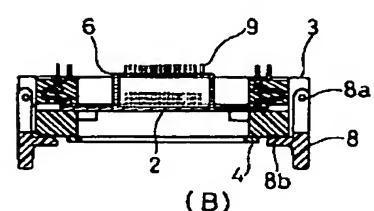
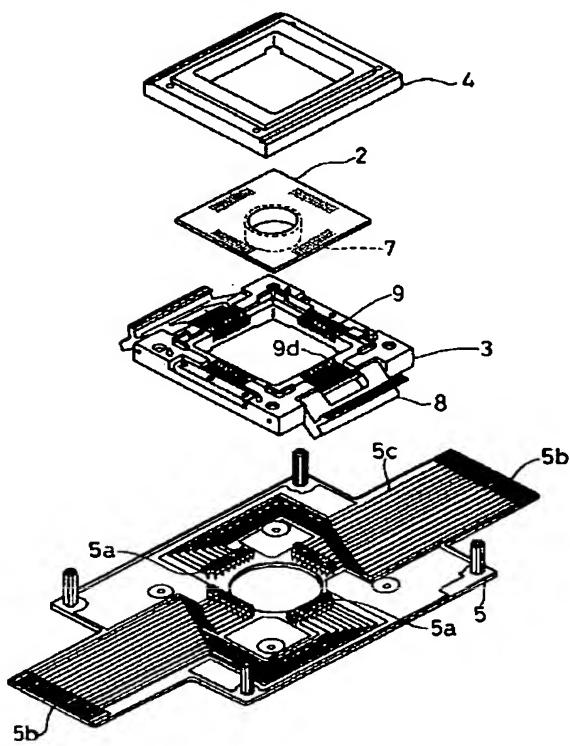
【図3】



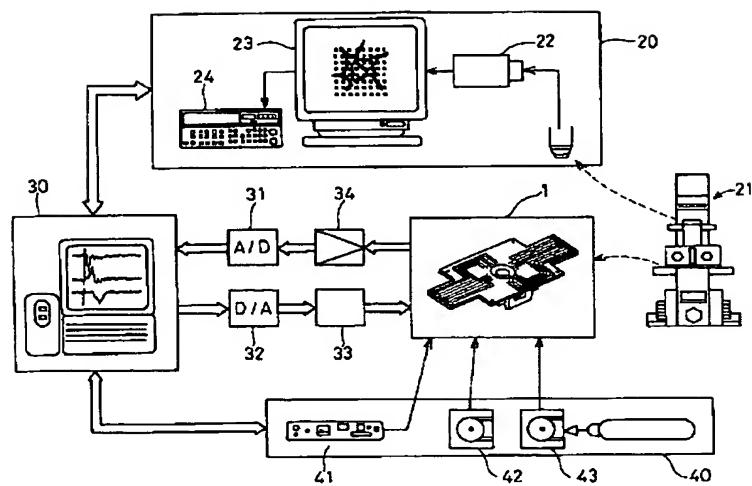
【図5】



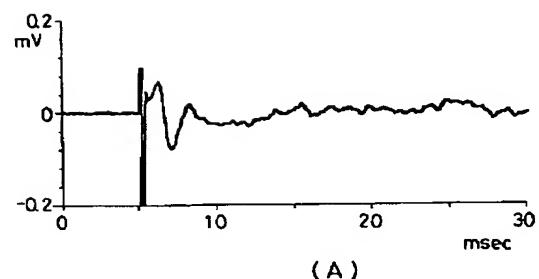
【図8】



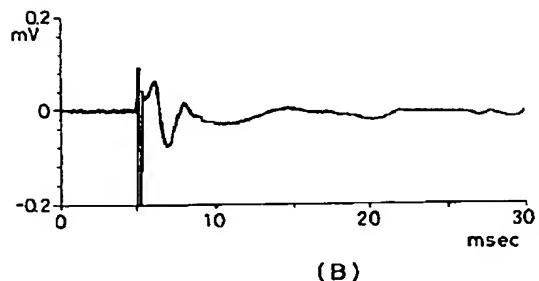
【図9】



【図10】

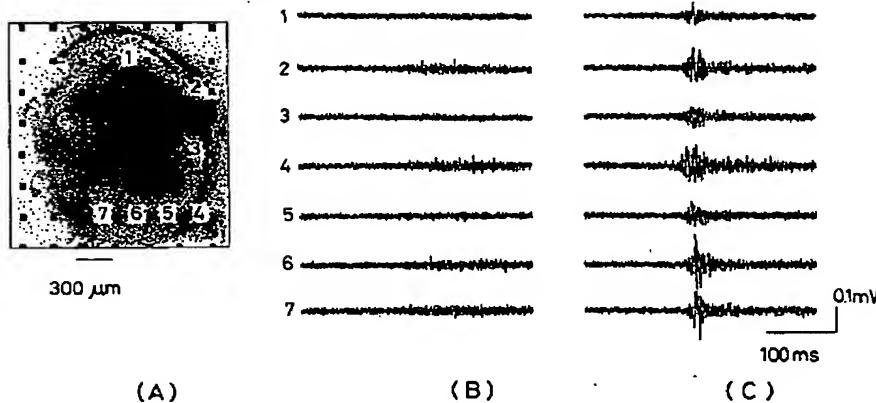


(A)

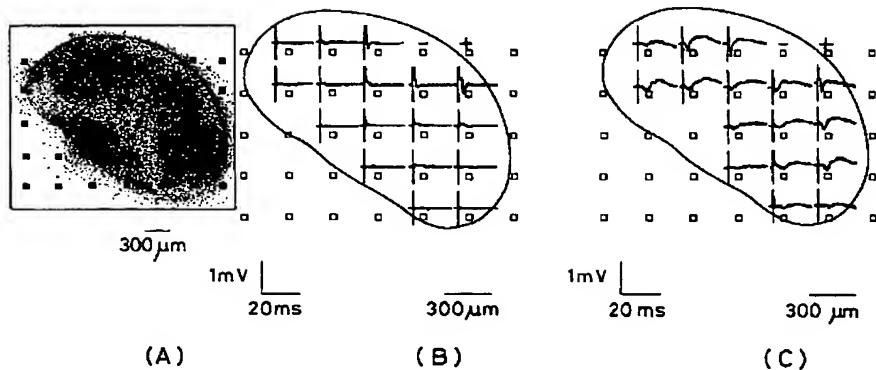


(B)

【図11】



【図12】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

G 0 1 N 27/28
27/416
33/483

識別記号 庁内整理番号

3 4 1 Z
E

F I

技術表示箇所

(72)発明者 竹谷 誠

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72)発明者 光亦 忠泰

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. *** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The cell potential measuring device for measuring the electrophysiology-property of a cell characterized by providing the following. A. The unification cell installation machine which was equipped with two or more microelectrodes on the substrate, was equipped with the cell installation section for placing a cell on it, and was equipped with the electrical connection means for deriving the electrical signal from the aforementioned microelectrode while giving an electrical signal to the aforementioned microelectrode. B. The stimulus-signal grant means connected to the electrical connection means of the aforementioned unification cell installation machine in order to give an electric stimulus to the aforementioned cell. C. The signal-processing means connected to the electrical connection means of the aforementioned cell installation machine in order to process the output signal by electric physiology activity of the aforementioned cell.

[Claim 2] Furthermore, a cell potential measuring device [equipped with the optical observation means for observing the aforementioned cell optically] according to claim 1.

[Claim 3] Furthermore, a cell potential measuring device [equipped with the cell culture means for maintaining the cultivation atmosphere of the cell placed on the aforementioned unification cell installation machine] according to claim 1.

[Claim 4] The cell potential measuring device according to claim 3 which a cell culture means becomes from the temperature control means which keeps temperature constant, a means to circulate through culture medium, and air and a means to supply the mixture of gas of a carbon dioxide.

[Claim 5] The aforementioned unification cell installation machine is a cell potential measuring device according to claim 1 by which the aforementioned cell installation section is prepared in two or more microelectrodes arranged in the shape of a matrix on a glass plate, the electric conduction pattern for drawers of these microelectrodes, electric contact connected to the edge of these electric conduction patterns, and the field which is equipped with a wrap insulation coat for the front face of the aforementioned electric conduction pattern, and contains two or more aforementioned microelectrodes.

[Claim 6] The cell potential measuring device according to claim 1 by which 64 electrodes are arranged as two or more aforementioned microelectrodes at eight trains of eight lines.

[Claim 7] Each electrode area of the aforementioned microelectrode is 2 4x102 to 4x104 micrometers. Cell potential measuring device according to claim 1 in within the limits.

[Claim 8] The aforementioned electrical connection means is a cell potential measuring device containing 2 division electrode holder which has the contact metallic ornaments in contact with aforementioned electric contact, and is fixed on both sides of the aforementioned glass plate from the upper and lower sides according to claim 5.

[Claim 9] The aforementioned electrical connection means is a cell potential measuring device according to claim 5 further equipped with the printed wired board which has the external connection pattern connected to the contact metallic ornaments of the aforementioned electrode holder through a connector while fixing the aforementioned electrode holder.

[Claim 10] The cell potential measuring device according to claim 8 the contact resistance of

aforementioned electric contact and the aforementioned contact metallic ornaments and whose contact resistance of the aforementioned contact metallic ornaments and the aforementioned connector are 30 or less milli ohms, respectively.

[Claim 11] The cell potential measuring device according to claim 1 which the aforementioned optical observation means equips with the image pick-up equipment and image display equipment which were connected with the optical microscope at this.

[Claim 12] The cell potential measuring device according to claim 10 which the aforementioned optical observation means equips with picture storage further.

[Claim 13] The cell potential measuring device according to claim 1 whose aforementioned stimulus-signal grant means is a pulse signal generator.

[Claim 14] A cell potential measuring device [equipped with the multi-channel amplifier with which the aforementioned signal-processing means amplifies the output signal by electric physiology activity of the aforementioned cell, and the multi-channel display which gives a real-time indication of the amplified signal wave form] according to claim 1.

[Claim 15] A cell potential measuring device [equipped with the computer which inputs and processes the output signal by electric physiology activity of the aforementioned cell through an A/D converter, and performs control of the aforementioned optical observation means and the aforementioned cell culture means while outputting the aforementioned stimulus signal through a D/A converter] according to claim 1.

[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] this invention relates to the cell potential measuring device used in the so-called field of the electric neurophysiology which measures the potential change accompanying activity of a nerve cell etc.

[0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, medical examination of a nerve cell, examination of the applicability as electric element, etc. have been performed actively. In case a nerve cell works, an action potential occurs. This action potential is produced, when the ion concentration of cell membrane inside and outside changes with change of the ionic permeability of a nerve cell and cell membrane potential changes in connection with this. Then, activity of a nerve cell is detectable by measuring the potential change accompanying the ion concentration change near the nerve cell (namely, ion current) by the electrode.

[0003] Measurement of ***** by the above cell activities can be performed by inserting the glass electrode for cell foreign news grade measurement in a cell. When measuring the evoked potential by stimulus, the metal electrode for a stimulus is also inserted with the glass electrode for record. However, it is difficult for there to be a possibility of doing an injury to a cell in measurement by these electrode insertion, and to measure over a long time. Moreover, there is a problem on a limit spatial also about measuring two or more places simultaneously and position precision.

[0004] Then, on the insulating substrate, the conductive matter was used, two or more microelectrode and its cash-drawer pattern were formed, and the unification composite electrode which made the cell culture on this possible was invented by this invention persons (refer to JP,6-78889,A and JP,6-296595,A). If this unification composite electrode is used, in two or more places of a narrow interval, potential change can be measured simultaneously, without receiving spatial restrictions, and, moreover, it can measure over a long time.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, such a unification composite electrode was utilized for the maximum, and while being able to measure correctly and efficiently, it desired strongly, the measuring device, i.e., the gaging system, which can give facilities to arrangement of a measurement result. this invention aims at offering the cell potential measuring device which suits this request.

[0006]

[Means for Solving the Problem] The cell potential measuring device by this invention is equipped with two or more microelectrodes on A. substrate. The unification cell installation machine which was equipped with the cell installation section for placing a cell on it, and was equipped with the electrical connection means for deriving the electrical signal from the aforementioned microelectrode while giving an electrical signal to the aforementioned microelectrode, B. It is characterized by having the stimulus-signal grant means connected to the electrical connection means of the aforementioned cell installation machine in order to give an electric stimulus to the aforementioned cell, and the signal-processing means connected to

the electrical connection means of the aforementioned cell installation machine in order to process the output signal by electrophysiology activity of the C. aforementioned cell.

[0007] The measurement covering a long time is attained by having had the optical observation means for observing the aforementioned cell optically preferably, and having further the cell culture means for maintaining further the cultivation atmosphere of the cell placed on the aforementioned unification cell installation machine.

[0008] About other desirable composition, it mentions later with an operation.

[0009]

[Function] The outline of measurement by the equipment of this invention equipped with the above composition is performed as follows, for example. The cell which is a sample is set to the cell installation section of a unification cell installation machine, and two or more microelectrodes contact the cell. while referring to the image of the cell obtained by the optical observation means -- a stimulus-signal grant means -- an electrical connection means -- minding -- two or more microelectrodes -- a stimulus signal is impressed to inter-electrode [of inner arbitrary couples] Time change of the evoked potential obtained by each of other electrode is given to a signal-processing means through an electrical connection means, and is outputted to display etc. through required signal processing. In addition, measurement of the spontaneous potential which does not give a stimulus signal is performed similarly.

[0010] Since it is necessary to perform electrochemical measurement of the above cells in the state where the cell is valid, usually, the cultured cell was used and the cell installation section of a unification cell installation machine is equipped with the culture medium. Although a unification cell installation machine can be freely detached and attached to a measuring device, and it puts into the usual incubator the whole unification cell installation machine, a unification cell installation machine is taken out from an incubator in case it measures by performing a cell culture, and you may make it set in a measuring device, when it has further the cell culture means for maintaining the cultivation atmosphere of the cell on a unification cell installation machine, it becomes that the measurement covering a long time is possible. This cell culture means consists of a temperature control means which keeps temperature constant, a means to circulate through culture medium, and air and a means to supply the mixture of gas (for example, CO25%) of a carbon dioxide.

[0011] Preferably, the aforementioned unification cell installation machine is equipped with a wrap insulation coat for two or more microelectrodes arranged in the shape of a matrix (the shape of a grid) on a glass plate, the electric conduction pattern for drawers of these microelectrodes, electric contact connected to the edge of these electric conduction patterns, and the front face of the aforementioned electric conduction pattern, and the aforementioned cell installation section is prepared in the field containing two or more aforementioned microelectrodes. Optical observation of a cell becomes easy by using a transparent glass plate as a substrate. Therefore, it is desirable that an electric conduction pattern and an insulating coat are also substantially transparent or translucent. Moreover, it is a plain-gauze cone about the tab control specification of the electrode which will impress a stimulus signal if two or more microelectrodes are arranged in the shape of a matrix, or the electrode which detects the voltage signal by cell activity. For example, it is desirable to arrange 64 microelectrodes in eight trains of eight lines. Moreover, from a viewpoint which makes surface electrical resistance as small as possible, and raises detection sensitivity, although the surface area of each electrode has the larger possible good one, it takes into consideration the resolution of the restrictions from an electrode spacing, and measurement etc., and it is 4x102 to 4x104. μm^2 It is desirable that it is in within the limits.

[0012] As for the aforementioned electrical connection means, it is desirable that 2 division electrode holder which has the contact metallic ornaments in contact with aforementioned electric contact, and is fixed on both sides of the aforementioned glass plate from the upper and lower sides is included, and the cash drawer to fixation of the aforementioned glass plate and the exterior of a microelectrode is performed easily and certainly by such structure. Furthermore, while fixing the aforementioned electrode holder, it is desirable to have further the printed wired board which has the external connection pattern connected to the contact metallic ornaments of

the aforementioned electrode holder through a connector, and, thereby, connection with an external instrument, i.e., a stimulus-signal grant means, and a signal-processing means becomes easy. It is desirable that the contact resistance of aforementioned electric contact and the aforementioned contact metallic ornaments and the contact resistance of the aforementioned contact metallic ornaments and the aforementioned connector are 30 or less milli ohms as much as possible about a stimulus signal or a detecting signal, respectively attenuation and in order to be distorted and to transmit that there is nothing.

[0013] As for the aforementioned optical observation means, it is desirable to have the image pck-up equipment and image display equipment which were connected with the optical microscope at this. That is, measuring grasping a cell and an electrode position visually becomes easy by picturizing the image of the cell expanded under the microscope with image pck-up equipment (video camera), and displaying it on image display equipment (high definition display). Still more preferably, if the optical observation means is equipped with picture storage, it is convenient for record of a measurement result etc.

[0014] Moreover, they can be impressed to a cell by using a pulse signal generator for the aforementioned stimulus-signal grant means, using many kinds of signal wave forms as a stimulus signal. As for the aforementioned signal-processing means, it is desirable that the signal wave form (time change of cell potential) which was equipped with the multi-channel amplifier which amplifies the detecting signal by cell activity, and the multi-channel display which gives a real-time indication of the amplified signal wave form, and was obtained from two or more electrodes can be displayed simultaneously.

[0015] It is desirable to have further the computer which, on the other hand, inputs and processes the output signal by electric physiology activity of the aforementioned cell through an A/D converter while outputting the aforementioned stimulus signal through a D/A converter. by this It sets a stimulus signal as arbitrary waves on a screen, or various processings are given and displayed it not only displays the wave of a detecting signal on a screen, but, and it outputs to a plotter, or memorizing becomes easy. Furthermore, control of the aforementioned optical observation means or the aforementioned cell culture means can also be performed using this computer.

[0016]

[Example] The example of this invention is explained based on a drawing below.

[0017] First, the unification cell installation machine used for this measuring device is explained. As this unification cell installation machine 1 shows a perspective diagram to drawing 1 and shows assembly drawing to drawing 2, respectively, it consists of the unification composite electrode 2 by which two or more microelectrode and its cash-drawer pattern were prepared in the glass plate, 2 division electrode holders 3 and 4 fixed on both sides of it from the upper and lower sides, and a printed wired board 5 which fixes this electrode holder.

[0018] About a unification composite electrode, it is the same as that of what is indicated by JP,6-78889,A etc. almost. 64 microelectrodes 11 are formed in the center section of the substrate which consists of a transparent Pyrex glass of 1.1mm in thickness, and a size the angle of 50mm in the shape of [of 8x8] a matrix, and the electric conduction pattern 12 for cash drawers is connected to each microelectrode (refer to drawing 3). Each electrode 11 is 50-micrometer angle (area 25x102micrometer²), and the pitch of the adjoining electrode is 450 micrometers. moreover, 16 each and a total of 64 electric contact 7 are formed in four sides of a substrate (refer to drawing 2), and these electric contact and 64 microelectrodes of a substrate center section correspond to them by 1 to 1 -- as -- pulling out -- business -- it connects by the electric conduction pattern 12 16 electric contact of each side is located in a line by pitch 1.27mm. The manufacture method of this unification composite electrode 2 is explained below based on the cross section of drawing 4 . In addition, drawing 4 is changing and drawing the scale of each part for conspicuousness.

[0019] The ITO (indium oxide tin) film of 150nm ** is applied to the front face of the glass plate 13, and the electric conduction pattern 12 is formed by the photoresist and etching. Besides the negative photograph sensitive polyimide film of 1.4-micrometer ** is applied, and the insulating coat 14 is formed similarly. The ITO film is exposed and the portions of a microelectrode and

electric contact perform the nickel plating 15 of 500nm **, and gold plate 16 of 50nm ** to this portion. Silicone (minding electric conduction pattern 8 and insulating coat 9) system adhesives are used for a glass plate, and the cylinder-like polystyrene frame 6 (refer to drawing 2) with the bore of 22mm, an outer diameter [of 26mm], and a height of 8mm is pasted up. This cylinder-like polystyrene frame is fixed where main doubling is carried out to the center of a glass plate, i.e., the core of 64 microelectrodes, and the inside of this polystyrene frame is equivalent to the cell installation section. A platinic chloride, 0.01-% of the weight lead acetate, and the solution of a 0.0025-% of the weight hydrochloric acid are filled 1% of the weight within this polystyrene limit, and platinum black 11a is deposited on the front face of gold plate of the microelectrode section by energizingmA [of the current of 2 / 20 / /] for 1 minute cm.

[0020] Next, 2 division electrode holders 3 and 4 fixed on both sides of the unification composite electrode 2 from the upper and lower sides are explained. The center section is equipped with the step and rectangle opening for holding the marginal part of the unification composite electrode 2, as electrode holders 3 and 4 are formed by the resin and shown in drawing 2 . The up electrode holder 3 is equipped with the fastener 8 of a couple, and the 16 piece x4 pair contact metallic ornaments 9. The perspective diagram which saw the side elevation (B-B cross section) for the plan of the electrode holders 3 and 4 fixed on both sides of the unification composite electrode 2 from drawing 5 (B) and the background to drawing 5 (A) is shown in drawing 6 , respectively. The fastener 8 is supported pivotably by axial pin 8a by two sides which the up electrode holder 3 counters so that it may understand also from these drawings.

Moreover, slot 4a is formed in two sides which the rear face of the lower electrode holder 4 counters, and when protruding line 8b of a fastener 8 fits in here, the up-and-down electrode holders 3 and 4 are firmly fixed, where the unification composite electrode 2 is inserted.

[0021] Although 64 contact metallic ornaments 9 formed up electrode-holder 3 gave nickel and Au plating to BeCu, they process the good conductor metal plate which is rich in elasticity [like], and are formed, so that it may correspond to electric contact 7 of the unification composite electrode 2, and the configuration as shown in drawing 7 is carried out. That is, it consists of 9d of the movable contact sections prolonged through bend 9c from pin section 9a, base 9b, and this base 9b. By such structure, elastic displacement is possible for 9d of movable contact sections to base 9b. The hole with which pin section 9a of the contact metallic ornaments 9 is inserted in the up electrode holder 3, and the slot into which base 9b gets are formed in 64 (16x4) parts.

[0022] it is shown in drawing 2 and drawing 5 (B) -- as -- the contact metallic ornaments 9 -- the above -- pin section 9a has projected from the up electrode holder 3 in the state where it was inserted and fixed to the hole and the slot By arranging by turns the contact metallic ornaments 9 which are two kinds from which the length of base 9b differs, 16 pin sections 9a which projected from the up electrode holder 3 is located in a line with two alternate trains. Such pin section 9a is connected to the connector mounted in the printed wired board 5 for connection with the exterior so that it may mention later.

[0023] On the other hand, 9d of movable contact sections of the contact metallic ornaments 9 is in the state where the contact metallic ornaments 9 were inserted and fixed to the hole and slot of the up electrode holder 3, and they are projected from the inferior surface of tongue of the up electrode holder 3. This state is well shown in drawing 8 which is the assembly drawing seen from the opposite side to the assembly drawing of drawing 2 . Where electrode holders 3 and 4 are fixed on both sides of the unification composite electrode 2, 9d of movable contact sections of each contact metallic ornaments 9 contacts electric contact 7 of the unification composite electrode 2, and predetermined contact pressure is given to the contact section by the elastic deformation of bend 9c. Thus, electric contact 7 connected to the microelectrode 11 of the unification composite electrode 2 through the electric conduction pattern 12 is electrically connected by small contact resistance (30 or less milli ohms) to the contact metallic ornaments 9.

[0024] Next, a printed wired board 5 is explained. This printed wired board 5 is bearing the duty which pulls out further outside the electrical connection which results in the electric conduction pattern 12, electric contact 7, and the contact metallic ornaments 9 through a connector from

the microelectrode 11 of the unification composite electrode 2 while fixing the assembly of the unification composite electrode 2 and electrode holders 3 and 4. moreover, the handling of the set to a measuring device etc. is made easy -- work -- ****.

[0025] This printed wired board 5 is constituted using the glass epoxy-group board of a double-sided pattern, and connector 5a is prepared in the four circumferences of circular opening formed in the center section in the rear face shown in drawing 8. By being inserted in connector 5a to which 16 pin sections 9a alternately projected two trains from four front faces of the up electrode holder 3 corresponds, respectively, while the assembly of the unification composite electrode 2 and electrode holders 3 and 4 is fixed to a printed wired board 5, it connects electrically.

[0026] Electric contact of 2.54mm pitch for double-sided edge connectors is formed in both-sides edge section 5b of a printed wired board 5, such electric contact and connector 5a of a center section pull out, and it connects by pattern 5c. The inside train of both-sides connector 5a is a surface pattern, an outside train is drawn out by the rear-face pattern, respectively, and 32 pieces, therefore a total of 64 electric contact are formed in each edge section 5b by front reverse side both sides. In order to make mechanical fixation into a positive thing, the up electrode holder 3 is also fixable to a printed wired board 5 by the screw stop.

[0027] The suitable example of the cell potential measuring device constituted using the unification cell installation machine 1 constituted as mentioned above is shown in drawing 9. The measuring device of this example is equipped with the computer 30 including a means to process the unification cell installation machine 1 mentioned above, the optical observation means 20 containing the inverted microscope 21 for observing optically the cell set to this unification cell installation machine 1, a means to give the stimulus signal to a cell, and the output signal from a cell, and the cell culture means 40 for maintaining the cultivation atmosphere of a cell.

[0028] The SIT camera (Hamamatsu Photonics C2400 -08 equivalent) 22, the high definition display 23, and the image file equipment (Matsushita Electric Industrial TQ- 2600 or FTQ-3100F equivalent) 24 for microscopes other than the inverted microscope 21 (Olympus IMT-2-F or IX70 equivalent) with which the unification cell installation machine 1 is set are contained in the optical observation means 20. However, a high definition display may make the display of a computer 30 serve a double purpose. In addition, the concrete equipment shown in the above-mentioned parenthesis is an example, and is not restricted to these. It is the same as that of the following.

[0029] What carried an A/D-conversion board and the software for measurement is used for the personal computer of WINDOWS correspondence by the computer 30. The A/D-conversion board contains A/D converter 31 and D/A converter 32 of drawing 9. A/D converter 31 is 16-bit 64 channels, and D/A converter 32 is 16-bit eight channels.

[0030] The software for measurement includes the software for setting up the conditions of stimulus-signal grant, and the acquired record conditions of a detecting signal. By this software for measurement, a computer 30 not only constitutes a means to give a stimulus signal to a cell, and a means to process the signal detected from the cell, but manages control of an optical observation means (a SIT camera and image file equipment) or a cell culture means. Below, the main specifications of the software for measurement are explained for every screen.

[0031] On a parameter setup screen, a setup of complicated stimulus conditions is possible by drawing a stimulus wave on a screen using a keyboard or a mouse. Moreover, a setup of record conditions enables it to correspond to continuation record of several hours by 64 input channel and sampling rate 10kHz. Furthermore, it enables it to specify by directing the micro mirror image displayed on the screen with a mouse or a pen about specification of the electrode which gives a stimulus signal, or the electrode which takes out the detecting signal from a cell. In addition, a setup of terms and conditions, such as temperature of the cell culture means 40 and pH, can be performed using a keyboard.

[0032] In a record screen, a maximum of 64 the spontaneous action potentials or induced potentials which were detected from the cell are displayed on real time. Moreover, the recorded spontaneous action potential or induced potential can also be displayed on the micro mirror image of a cell in piles. In evoked-potential measurement, the whole record wave is displayed. In

spontaneous action-potential measurement, a record wave is displayed only when generating of spontaneous activity is detected by the spike detection function in which the window discriminator or the wave discriminator was used. With the display of a record wave, the measurement parameters at the time of record (stimulus conditions, record conditions, temperature, pH, etc.) are also expressed as real time. It also has the alarm function when temperature or pH separates from tolerance.

[0033] On a data analysis screen, FFT analysis, coherence analysis, and correlation analysis are possible. It has the single spike isolation using the wave discriminator, the temporal profile display function, the topography display function, the current-source density analysis feature, etc. These analysis results can be displayed on the micro mirror image saved to image file equipment in piles.

[0034] when a stimulus signal is outputted from the above computers 30, this stimulus signal should pass D/A converter 32 and an isolator (BSI-2 made from BAK ELECTRONICS equivalent) 33 -- it is given to a cell. That is, a stimulus signal is impressed in two points as which it was chosen of the 64 microelectrodes 11 of the unification cell installation machine 1. And the evoked potential produced between each microelectrode 11 and GND level (potential of culture medium) is inputted into a computer 30 through the high sensitivity amplifier (Nihon Kohden AB-610J equivalent) 34 and A/D converter 31 for 64 channels. In addition, the amplification factor of amplifier 34 is 100dB, and a frequency band is 0-10kHz. However, in measurement of the induced potential by the stimulus signal, it is made into the 100Hz - 10kHz frequency band by the low cut filter.

[0035] Next, the cell culture means 40 is equipped with the thermoregulator 41, the circulation means 42 of culture medium, and a means 43 to supply the mixed gas of air and a carbon dioxide. In fact, the cell culture means 40 is constituted using micro incubator PDMI-2 equivalent made from Medical Systems, temperature-controller TC-202 equivalent, CO₂ bomb, etc. This micro incubator can be controlled by the Peltier element to a 0-50-degree C temperature requirement, and can respond to 3.0 or less ml/min of *** speed, and 1.0 or less l/min of air-supply speed. Or you may use the micro incubator (Olympus IMT2-IBSV) which builds in the temperature controller.

[0036] As mentioned above, although the suitable example of the cell potential measuring device by this invention was explained, various change implementation which it is not limited to the above-mentioned example and described below is possible for the cell potential measuring device by this invention.

[0037] Although the above-mentioned example constituted a means to give a stimulus signal to a cell from the computer and the D/A converter, you may constitute from a pulse signal generator of wide use or exclusive use. In addition, in order to remove the influence of the artifact (i.e., in order to make it a dc component not flow), as for a stimulus signal, it is desirable to consider as the bipolar constant-voltage pulse which consisted of pulses of a positive/negative couple.

Moreover, it is desirable to change into a constant-current pulse so that an overcurrent may not be passed. For example, a stimulus signal consists of a right pulse of 100micro sec of pulse width, an interval of 100microsec, and a negative pulse of 100microsec, and, as for the peak current of a positive/negative pulse, it is desirable that it is within the limits of 30-200microA.

[0038] Moreover, although the conitinous measurement over a long period of time is possible by equipping the measuring device with the cell culture means 40, it cultivates setting a sample cell to a unification cell installation machine, and a unification cell installation machine is taken out from an incubator only in the case of short-time measurement, and you may make it set it in a measuring device comparatively within the incubator installed apart from the measuring device. In this case, a measuring device does not need to be equipped with the cell culture means 40.

[0039] The example which measured the nerve cell actually cultivated on the unification cell installation machine or the potential change accompanying activity of an organization is explained below using the above cell potential measuring devices. It cultivated by the method shown in the cultivation example mentioned later, using the intercept of a rat cerebral cortex as nervous tissue.

[0040] First, the result which compared the voltage waveform measured using the unification cell

installation machine of this equipment with the voltage waveform measured using the conventional general-purpose glass electrode (electrode for cell foreign news grade measurement) is explained. Measurement performed as a sample nervous tissue which passed 14 days after a cultivation start. The stimulus signal was impressed to inter-electrode [which the unification composite electrode which constitutes a unification cell installation machine adjoins / two], and the wave of time change of an evoked potential by which induction is carried out to eight electrodes near it was measured. And in order to compare, the 3-dimensional micro manipulator was used, the glass electrode was moved one by one near the eight above-mentioned electrodes, and the same voltage waveform was measured.

[0041] As mentioned above, as a result of comparing the voltage waveform measured using the unification composite electrode (unification cell installation machine) about eight places with the wave measured using the glass electrode, both wave could be set in which part and was approximated. The example of representation is shown in drawing 10 (A) and (B). Drawing 10 (A) shows the measurement wave by the unification composite electrode, and drawing 10 (B) shows the measurement wave by the glass electrode. When both waves are compared, it turns out that a difference is in the frequency characteristic a little. Compared with the measurement for which the measurement using the glass electrode used the unification composite electrode (Purana electrode), the flattery nature to a quick potential change is spoiled a little. It is thought that this difference originates in the difference of the electric capacity which a glass electrode and the Purana electrode have.

[0042] Next, the experimental result which investigated the relation between the cultivation days of the nerve cell cultivated on the unification cell installation machine and the distribution of the potential by activity of a cell is explained. In addition, in advance of cultivation of a cell, the front face of a unification composite electrode was worn by collagen gel in order to raise the adhesive property of each electrode of a unification composite electrode, and a cell. That is, collagen gel with a thickness of 50 micrometers or less was formed in each electrode front face covered with platinum black as mentioned above, and the insulating coat front face of the circumference of it. and a collagen gel top -- and the intercept (500 micrometers or less in thickness) of a rat cerebral cortex was placed and cultivated so that it might be located on a microelectrode. The measurement result of the evoked potential when giving the measurement result of spontaneous potential to drawing 11 , and giving a stimulus signal to drawing 12 is shown.

[0043] The sample cell and the micro mirror image of a microelectrode are shown in drawing 11 (A), and the wave of the spontaneous potential measured by seven electrodes directed in this image by 1-7 is shown in drawing 11 (B) and (C), respectively. Drawing 11 (B) is a wave on the 6th after cultivation, and drawing 11 (C) is a wave on the 10th after cultivation. The time of the scale of a micro mirror image and a measurement wave and the scale of voltage are as being shown all over drawing. When it consists of this measurement result after cultivation on the 10th to electrode mutual synchronicity with weak spontaneous activity of the cell measured by each electrode in the 6th day hardly being seen for example, after cultivation, it turns out that many nerve cells come to work simultaneously and the synchronicity between electrodes is increasing.

[0044] The sample cell and the micro mirror image of a microelectrode are shown in drawing 12 (A). And the profile of a cell and the position of each electrode are drawn on a screen from this micro mirror image, and what displayed in piles the voltage waveform measured by each electrode is further shown to drawing 12 (B) and (C) by the image processing included in the software for measurement of the above-mentioned computer. As for drawing 12 (B), drawing 12 (C) shows the distribution of an evoked potential on the 10th after cultivation after cultivation on the 5th, respectively. The electrode of the couple directed by + in the upper right and - is an electrode to which the stimulus signal was impressed. The wave measured by the electrode is displayed immediately on the small square sign which shows the position of each electrode. In these waves, potential change the portion which a left end is large and is swaying perpendicularly is the artifact corresponding to a stimulus signal directly, and it is changeful after that shows actual cell activity. Although activity of a cell is restricted for example, after cultivation from this measurement result comparatively near the electrode position which impressed the stimulus

signal in the 5th day, when it becomes after cultivation on the 10th, activity of a cell is observed over the latus range, the size (amplitude) is large and a bird clapper understands it.

[Cerebral-cortex cultivation example]

(1) The following additives were added and used for the 1:1 mixture culture medium (GIBCO Co. and LTD.430-2500EB) of a culture-medium Dulbecco alteration Eagle's medium and hum F12 culture medium.

* Glucose (glucose, GIBCO 820-5023IN) 2.85 mg/L (together with what is contained in the above-mentioned culture medium from the first, it becomes total 6 mg/L)

* Putrescine () [putrescine,] [SIGMA] Co. and LTD. P5780 100microM -- a * PUROJIE sterone (progesterone, SIGMA P8783) 20nM* hydro cortisone (hydrocortisone, SIGMA H0888) 20nM* sodium selenite () [sodium] selenite, WAKO Co., and LTD. 198-0319 -- 20nM* insulin (insulin and SIGMA 16634) 5 mg/L* transferrin (transferrin, SIGMA T1147) 100 mg/L* sodium bicarbonate 2.438 mg/L*1N HCl -- or 1 N NaOH is adjusted to optimum dose **** and pH 7.4.

[0045] After adding the above additive and carrying out filtration sterilization, it saved at 4 degrees C and prepared for use. Hereafter, this culture medium is only called "culture medium."

(2) In order to plan the nerve cell on the composition unification composite electrode of the well on a unification composite electrode, or the facilities of cultivation of nervous tissue, the cylinder made from polystyrene with the bore of 22mm, an outer diameter [of 26mm], and a height of 8mm was pasted up by the method of indicating below.

(b) Carry out the need 10 quantity application of the 1 fluidity silicon system adhesives (Dow Corning 891 or Shin-etsu chemistry KE-42RTV) on the inferior surface of tongue of the cylinder made from polystyrene (the bore of 22mm, the outer diameter of 26mm, a height of 8mm).

(b) Paste both up, taking care that the glass-substrate center of a unification composite electrode and the center of the cylinder made from polystyrene are in agreement.

(c) Solidify adhesives by leaving it in the environment where dust cannot enter easily for 24 hours.

(d) Sterilize by being air-dry within a clean bench after soaking in ethanol 70% for 5 minutes, and prepare for processing on the front face of an electrode.

(3) In order to raise the cellular adhesiveness of the processing unification composite-electrode front face on the front face of an electrode, collagen gel consisted of the following methods on the electrode front face. All the following operations were performed under a sterile atmosphere.

(b) Prepare the following solutions of A, B, and C and ice-cool.

A.0. Without adding a sodium bicarbonate to the 1:1 mixture culture medium (GIBCO 430-2500EB) of a .% diluted-hydrochloric-acid collagen solution (pH 3.0, Nitta gelatin Cellmatrix TypeI-A) B. double BEKKO alteration eagle solution and hum F12 culture medium 3 vol Usually, C.0.05 N thing which made the liquid of 10 time concentration at the time of using, and carried out filtration sterilization As opposed to sodium-hydroxide solution 100mL A, B, and C liquid are mixed at a rate of 8:1:1, having melted and carried out filtration sterilization of 2.2g of sodium bicarbonates, and the HEPES(GIBCO 845-1344IM)4.77g, and thing-(b)-cooling. Under the present circumstances, after often mixing A and B, C is added, and it mixes further.

(c) the well of the unification composite electrode beforehand cooled at about 4 degrees C -- remove a mixed solution as much as possible with a glass path tool pipet after pouring mixed-solution 1mL of RO distributively inside and making an electrode front face wear uniformly to it The coat of the liquid for mixture with a thickness of 50 micrometers or less is constituted on an electrode front face by this operation.

(d) By warming the unification composite electrode which constituted the liquid coat for mixture by 37 degrees C for 30 minutes, make the liquid for mixture gel and constitute a collagen matrix.

(e) the well of a unification composite electrode -- add sterilized-water 1mL inside and wash by removing, after leaving it for about 5 minutes

(**) -- operation of (**) is repeated twice [more] (a total of 3 times)

(**) -- the well of a unification composite electrode -- thing (however, insulin and transferrin are removed) 1mL which added the above-mentioned additive to the 1:1 mixture culture medium (GIBCO 430-2500EB) of the Dulbecco alteration Eagle's medium and hum FH12 culture medium

inside -- pouring distributively -- the temperature of 37 degrees C, 97% or more of relative humidity, and CO₂ maintained at 5% of concentration, and 95% of air concentration It saves in an incubator and prepares for use.

(4) A nerve cell or the cultivation cultivation gestalt of nervous tissue is roughly divided into two kinds. That is, they are distributed cultivation of a nerve cell, and the organ culture of nervous tissue. Hereafter, each is described.

(4-1) All operations below the distributed cultivation of a rat cerebral-cortex visual-area nerve cell were performed under bacillus-atmosphere.

(b) Extract the brain of the embryo of SD rat which passed 16 – 18 days after pregnancy, and dip in the ice-cooled Hanks balance **** (GIBCO 450-1250EB).

(b) Start visual cortex from the brain in ice-cooling Hanks balance ****, and move into torr MEM (GIBCO 410-1100EB) liquid.

(c) In eagle MEM liquid, it is fine as much as possible, and cut visual cortex so that it may become 0.2mm angle at the maximum.

(d) Put the visual cortex cut finely into the test tube for centrifugal separation, and distribute in this liquid of optimum dose after washing 3 times by the Hanks balance **** which does not contain calcium and magnesium.

(e) Add the Hanks balance **** which does not contain the calcium and magnesium which dissolved 0.25% of trypsin in the test tube for centrifugal separation of the above-mentioned (d), and double the whole quantity. while stirring gently -- 37 degrees C -- for 15 minutes -- constant temperature -- it maintains at a state and an enzyme reaction is made to perform (***) The culture medium shown above (1-1) (additive ****.) The whole quantity is further doubled [be / under adding / it] in the test tube for centrifugal separation which passed through above-mentioned HO hereafter what added the fetal calf serum of 10vol(s).% for abbreviating to a "culture medium" at the pan. With the glass path tool pipet which roasted the nose of cam over the burner and made aperture small, pipetting is repeated gently (about a maximum of 20 times), and each cell is isolated.

(***) -- at-long-intervals heart separation was performed by 9806.65 m/sec² (namely, 1000g) for 5 minutes A supernatant liquid is thrown away after a centrifugal separation end, and precipitation is suspended in the culture medium containing 5% of fetal calf serum.

(h) Repeat the aforementioned (**) twice [more] (a total of 3 times).

(i) Suspend the precipitation which might be final in the culture medium containing the fetal calf serum of 5vol.%, and measure the cell concentration in suspension using the number board of erythrocytometer. After measurement, it adjusts so that cell concentration may become [ml] in two to 4x10⁶ pieces /using the same culture medium.

(j) after passing through processing of the above (1-3) -- CO₂ the unification composite electrode saved in the incubator -- taking out -- a well -- an inner culture medium (however, an insulin and a transferrin are not included) is removed, and 500micro of culture media L which newly contain the fetal calf serum of 5vol(s).% is poured distributively Furthermore, 100micro of cell suspension L after cell concentration adjustment of RI is added calmly, and it is CO₂ again. It puts into an incubator.

(**) Exchange the moiety of a culture medium for a new thing three days after from the operation which is the aforementioned (j). The culture medium to exchange used the culture medium which does not contain fetal calf serum. By making concentration of fetal calf serum low, proliferation of cells other than a nerve cell (for example, clear cell) is suppressed.

The same culture-medium exchange as the above is performed day by day [1 – 2] after a (**).

(4-2) Rat cerebral-cortex intercept cultivation (b) From day [of after the birth / 2nd] SD rat, a brain is taken out and it dips in the ice-cooled Hanks balance **** containing a 0.25vol(s).%D-glucose.

(b) Remove the membrana cerebri adhering to the brain in entering [which was ice-cooled / HBSS] a 0.25vol(s).%D-glucose using a previous sharp pincette, warning against damaging a cerebral cortex.

(c) Using the minute scissors of an ophthalmic surgery, meet a corpus callosum and cut the place of the corpus callosum of one side of the cerebral cortex except the membrana cerebri to

about 500 micrometers from an occipital lobe side toward a frontal lobe side.

(d) Then, using the minute scissors of an ophthalmic surgery, cut a cerebral cortex by the thickness of 200-300 micrometers at right angles to the cutting plane of a (c), and make an intercept.

(e) Furthermore, the size of an intercept is adjusted to about 1x1 using the minute scissors of an ophthalmic surgery.

(**) the unification composite electrode prepared by the above-mentioned "processing of (3) electrode front face" -- CO₂ it takes out from an incubator and the cerebral-cortex intercept which adjusted the size is not damaged with a pipet with an aperture of 2mm or more -- as -- quiet -- sucking up -- the object for cultivation of a unification composite electrode -- a well -- it moves to inside

Warning against damaging a cerebral-cortex intercept using Pasteur pipette which roasted over the (g) burner and smoothed the nose of cam, it adjusts so that the layer structure of a cortex may turn to the upper surface and it may be located on an electrode.

(h) Change into the state where adjust the amount of a culture medium, the base of an intercept touches a culture medium, and the upper surface touches the open air after carrying a cerebral-cortex intercept on a unification composite electrode.

(i) Put a unification composite electrode into a sterilization Petri dish after adjustment of the amount of culture media, in order to prevent dryness of a culture medium, pour distributively about 5ml of 37-degree C sterilized waters to a Petri dish, and it is CO₂ again. It puts into an incubator.

(j) After that, it was cautious of the amount of a culture medium, and one culture-medium exchange was performed every day. Suppose that it is the same as that of the above-mentioned (h) about the amount of a culture medium.

[0046]

[Effect of the Invention] As mentioned above, the action potential can be measured simultaneously in two or more parts, without doing an injury to the valid cell set to the unification cell installation machine according to the cell potential measuring device of this invention, as explained. And it can carry out simultaneously by two or more electrodes also with measurement of the evoked potential which gives a stimulus to inter-electrode [arbitrary] and it not only can measure spontaneous potential, but is obtained from two or more arbitrary electrodes. Moreover, it is possible to decide the electrode which gives a stimulus signal or to also display in piles the voltage waveform obtained from each electrode on the image in which a cell and an electrode position are shown, checking the relation between a sample cell and an electrode position by the processing using the computer etc. from the micro mirror image obtained for example, by the optical observation means, and it can contribute greatly to conducting the experiment in the field of an electric neurophysiology etc. an efficient and exact thing.

[0047] Furthermore, continuous measurement over a long period of time can be performed in the state where it was stabilized, by having a cell culture means to maintain the cultivation atmosphere of the cell set to the unification cell installation machine, setting a sample cell in a measuring device.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] The perspective diagram of the unification cell installation machine used for the cell potential measuring device concerning one example of this invention

[Drawing 2] Assembly drawing of a unification cell installation machine

[Drawing 3] The plan showing 64 microelectrodes and cash-drawer pattern which were prepared in the center section of the unification composite electrode which constitutes a unification cell installation machine

[Drawing 4] Drawing showing the cross section of a unification composite electrode typically

[Drawing 5] The plan and side cross section showing the state where the upper part and the lower electrode holder were fixed on both sides of the unification composite electrode

[Drawing 6] The unification composite electrode of drawing 5 , and the perspective diagram of a vertical electrode holder

[Drawing 7] The side elevation of the contact metallic ornaments with which the up electrode holder was equipped

[Drawing 8] Assembly drawing of the unification cell installation machine seen from the direction contrary to drawing 2

[Drawing 9] The block block diagram of the cell potential measuring device concerning one example of this invention

[Drawing 10] Drawing showing an example of comparison with the voltage waveform by activity of the cultured cell measured using the unification cell installation machine used for the equipment of this invention, and the voltage waveform measured using the conventional general-purpose glass electrode (electrode for cell foreign news grade measurement)

[Drawing 11] Drawing showing the measurement result of the spontaneous potential of the cultured cell measured using the equipment of this invention

[Drawing 12] Drawing showing the measurement result of the evoked potential of the cultured cell measured using the equipment of this invention

[Description of Notations]

1 Unification Cell Installation Machine

2 Unification Composite Electrode

3 Up Electrode Holder

4 Lower Electrode Holder

5 Printed Wired Board

11 Microelectrode

12 Electric Conduction Pattern

20 Optical Observation Means

21 Inverted Microscope

22 SIT Camera

24 Picture Storage

30 Computer

31 A/D Converter

32 D/A Converter

33 Isolator

34 Multi-Channel Amplifier

40 Cell Culture Means

[Translation done.]

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-062209
(43)Date of publication of application : 08.03.1996

(51)Int.CI. G01N 33/48
A61B 5/04
G01N 1/28
G01N 27/28
G01N 27/416
G01N 33/483

(21)Application number : 07-144768 (71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO
LTD

(22) Date of filing : 12.06.1995

(72)Inventor : SUGIHARA HIROKAZU
KAMEI AKIHITO
KOBAYASHI YASUSHI
TAKEYA MAKOTO
MITSUMATA TADAYASU

(30)Priority

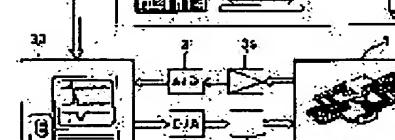
Priority number : 06130176 Priority date : 13.06.1994 Priority country : JP

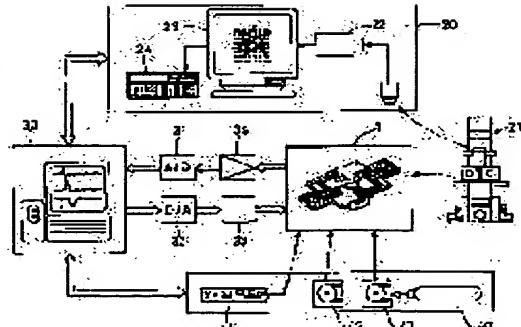
(54) CELL POTENTIAL MEASURING APPARATUS

(57)Abstract:

PURPOSE: To accurately and efficiently measure potential by arranging an integrated cell setting device having an electric connection means to apply electrical signals to minute electrodes while fetching the electrical signals from the minute electrodes.

CONSTITUTION: A cell as sample is set on a cell setting part of an integrated cell setting device 1 and a plurality of minute electrodes contact the cell. A stimulation signal from a computer 30 is applied to the cell via a D/A converter 32 and an isolator 33 referring to an image of the cell obtained by an optical observation means 20. In other words, the stimulation signal is applied between two points selected from among 64 minute electrodes of the integrated cell setting device 1. An induced potential between the minute electrodes and the potential of a culture liquid is inputted to the computer 30 via 64 channels of highly sensitive amplifiers 34 and A/D converters 31. Then, the potential is outputted to a display device 23 or the like through a necessary signal processing. Measurement of a spontaneous potential without application of the stimulation signal is performed in the same way.





LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 30.10.1997
[Date of sending the examiner's decision of rejection] 01.08.2000
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number] 3204875
[Date of registration] 29.06.2001
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office